

# Tillämpning av TMA-teknik vid undersökning av rabdomyosarkom

Oskar Westerlund

Medicine kandidat

Helsingfors universitet – medicinska fakulteten

Helsingfors 8.12.2020

Fördjupande studie

[oskar.westerlund@helsinki.fi](mailto:oskar.westerlund@helsinki.fi)

Handledare: Tom Böhling, Mika Sampo

HELSINGFORS UNIVERSITET

Medicinska fakulteten

Tiedekunta/Osasto - Fakultet/Sektion – Faculty		Laitos - Institution – Department	
Medicinska fakulteten		Avdelningen för patologi	
Tekijä/Författare – Author			
Oskar Westerlund			
Työn nimi - Arbetets titel – Title			
Tillämpning av TMA-teknik vid undersökning av rabdomyosarkom			
Oppiaine - Läroämne – Subject			
Patologi			
Työn laji - Arbetets art – Level		Aika - Datum – Month and year	Sivumäärä - Sidoantal - Number of pages
Fördjupande studie		12/2020	26 + 1
Tiivistelmä - Referat – Abstract			
<p><b>Bakgrund</b> Tissue Microarray-tekniken (TMA-tekniken) är en allt mer använd metod som används för att utvärdera expressionen av gener och genprodukter i hundratals vävnadsprover samtidigt. Cylindriska vävnadsprover extraheras från donatorparaffinblock och innesluts i ett enskilt TMA-block, vilket försnabbar vidare analyser av proverna.</p> <p>Rabdomyosarkom är en elakartad typ av tumör som har sitt ursprung i embryonalt mesenkym. Rabdomyosarkom är den vanligaste sarkomtypen och den tredje vanligaste extrakraniala tumören hos barn.</p> <p>Målsättningen vid denna studie var att producera ett TMA-material som utgjordes av rabdomyosarkomprover och att evaluera TMA-blockets användningsmöjligheter.</p> <p><b>Metoder</b> 138 rabdomyosarkomprover från åren 1982–2013 utvärderades. Av dessa inkluderades material från 56 vävnadsprover från 54 olika patienter i det slutgiltiga TMA-blocket. Snitten från TMA-blocket färgades immunohistokemiskt med desmin och Myf-4 för att verifiera rabdomyosarkompositiviteten.</p> <p><b>Resultat</b> Det producerades ett lyckat TMA-block. Av de 53 lyckade proverna färgades 75% positivt för antingen desmin, Myf-4 eller både och.</p> <p><b>Slutsatser</b> TMA-blocket som producerades kan i framtiden användas i andra forskningsprojekt inriktade på rabdomyosarkom.</p> <p>(157 ord)</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords			
Rhabdomyosarcoma alveolar; Rhabdomyosarcoma embryonal; Tissue Microarray			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited			
HELDA- Helsingfors universitets digitala publikationsarkiv			

# Index

1 Inledning.....	1
1.1 Sarkom.....	1
1.2 Rabdomyosarkom .....	4
1.2.1 Översikt .....	4
1.2.2 Allmänna genetiska förändringar .....	8
1.2.3 Immunohistokemi .....	9
1.2.4 Prognos.....	9
1.2.5 Stadieindelning och kliniska riskgrupper.....	10
1.2.6 Vård av rabdomyosarkom .....	13
1.3 Tissue Microarray-tekniken.....	14
2 Målsättning .....	16
3 Material och metoder .....	16
4 Resultat .....	17
5 Diskussion.....	20
6 Källförteckning .....	22

# 1 Inledning

## 1.1 Sarkom

Majoriteten av mjukdelstumörer är godartade, och prognosen är mycket god efter kirurgiskt avlägsnande av tumören. Benigna mesenkymaltumörer är över hundra gånger vanligare än de motsvarande maligna tumörerna, sarkomen (1). Till mjukdelstumörer räknas i allmänhet tumörer som fått sitt ursprung ur bindväv i extremiteter, bålväggen, det intraabdominala och intratorakala utrymmet, huvudet och nacken. Till mjukvävstumörer räknas inte bensarkom, icke-mesenkymala hudtumörer, kutana melanom, de flesta primära epiteltumörer samt hjärn- och bentumörer (2).

Sarkom är en heterogen grupp av ovanliga tumörer som får sin början i embryonalt mesenkym. Man antar att alla tumörer får sin början i multipotenta stamceller som är preprogrammerade till att differentieras till olika mogna celler. Detta förklarar varför en del sarkom påminner om sina motsvarande mogna celltyper. Mjukdelssarkom kan förekomma var som helst i kroppen, men de flesta tumörer hittas i extremiteterna (59%), bålen (19%), retroperitoneum (15%) eller huvudet och halsen (9%) (3). Över 50 olika histologiska undergrupper av sarkom har identifierats. De vanligaste är malignt fibröst histiocytom (28%), liposarkom (15%) och leiomyosarkom (12%). Rabdomyosarkom är den vanligaste typen av mjukdelssarkom hos barn (4).

I allmänhet är mjukdelssarkom inte en följd av dedifferentiering eller maligna förändringar i godartade mjukvävstumörer. De flesta sarkom beter sig både kliniskt och patologiskt lika trots den stora mängden histologiska undergrupper (2). Tack vare det kan ett gemensamt stadieindelningssystem användas för många olika typer av sarkom. Det mest använda systemet vid stadiebestämning av mjukdelssarkom utvecklades av Union for International Cancer Control (UICC) och American Joint Committee on Cancer (AJCC). Detta TNM-system tar såväl den histologiska graden som tumörstorleken och – djupet, lymfnodsspridningen samt metastaserna i beaktande (1).

Den typiska metastasrutten för mjukdelssarkom är hematogen. Lymfnodsmetastaser är ovanliga, och förekommer endast vid 5 % av fallen (5). Några undantag är epiteloida

sarkom, synovialsarkom, rabdomyosarkom och angiosarkom, vilka oftare metastaserar via lymfvägarna. Strålterapi är en välkänd riskfaktor för mjukvävssarkom, vilket märks av att incidensen för sarkom ökar med över 50 % hos patienter som strålbehandlats för befintlig cancer i bröst, cervix, äggstock, testikel eller lymfsystem (6). Andra riskfaktorer är onkogen virus samt utsättning för vissa kemikalier som ogräsbekämpningsmedel och impregnerat trä. Två DNA-virus har kopplats ihop till två specifika typer av mjukdelssarkom: humant herpesvirus 8 (HHV8) till Kaposi sarkom och Epstein-Barrvirus till vissa leiomyosarkom (2). Lymfangiosarkom kan uppkomma som en följd av kroniskt lymfödem i armen som uppstår efter evakuering av de axillära lymfknutorna.

Specifika genetiska förändringar kan kopplas ihop med en ökad risk för både ben- och mjukdelssarkom. Nedärvda genetiska förändringar som associerats till uppkomsten av sarkom är närmast funktionshinder i retinoblastomgenen och p53-suppressorgen (41, 42). Dessa nedärvda mutationer leder till uppkomsten av specifika sarkom vid ung ålder, till exempel leder en mutation i retinoblastomgenen till en ökad risk för osteosarkom (41). Förvärvade mutationer i onkogener som MDM2, N-myc, c-erb2 och medlemmar i ras-familjen har visat sig kunna leda till utveckling av sarkom (9). Cytogenetisk analys av mjukdelssarkom har också visat specifika kromosomtranslokationer som kodar för onkoproteiner som kan associeras med vissa histologiska undergrupper. Exempel på sådana genförändringar är WTS-AVF1-fusion vid klarcellssarkom och PAX3-FKHR-fusion vid alveolärt rabdomyosarkom (11).

Då man försöker ta reda på prognosen för en mjukdelstumör används två metoder och skalor. Graderingen baserar sig endast på histologiska undersökningar och evaluerar maligniteten och risken för metastaser. Då graden kombineras med klinisk information om tumören, kan man komma fram till ett cancerstadium, som ger information om tumörens utsträckning. Graderingskonceptet introducerades av Russell et al år 1977. Efter det har åtskilliga olika system utvecklats. Man rekommenderar att graderingen innehåller åtminstone tre grader, så att en tumör även kan graderas som intermediärt malign. De två mest använda graderingssystemen är NCI (United States National Cancer Institute) – systemet och FNCLCC (Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer) – systemet. I NCI-systemet beaktar man den histologiska typen, cellulariteten, pleomorfismen och mitosgraden då man väljer mellan grad 1 och 3. Sarkomen

klassificeras som grad 2 eller 3 beroende på nekrosgraden. Om nekrosgraden är över 15 %, klassificeras sarkomet som grad 3. FNCLCC-systemet baserar sig på ett poängantal som bestäms genom att utvärdera tre parametrar som väljs efter analys av flera histologiska egenskaper: tumördifferentiering, mitosgrad och mängden tumörnekros (1).

Det finns några brister med de nuvarande graderingssystemen. Då tumörproverna oftast tas genom nålbiopsier, begränsas graderingen av storleken på provbiten man fått och därför kan man ofta endast bestämma en minimigrad. Preoperativ vård som strålbehandling och kemoterapi kan göra det omöjligt att bestämma tumörens grad, eftersom dessa behandlingar orsakar nekros och cellförändringar. Vissa tumörtyper får nästan automatiskt en hög grad, och systemet kan vara mycket inexakt då det gäller ovanligare sarkomtyper då det forskats mindre kring dem. Till alla graderingssystem hör även en hög grad av subjektivitet, som minskar deras exakthet (2).

Bestämning av cancers stadium är en viktig del av en tumörs karakterisering, då informationen används vid vårdplaneringen, klinisk forskning och klinikopatologiska studier. Vid bestämning av cancers stadium används både histologisk och klinisk information. Systemet som används vid mjukdelssarkom utvecklades av Union for International Cancer Control (UICC) och American Joint Committee on Cancer (AJCC). Systemet verkar vara kliniskt relevant och har ett prognostiskt värde. Detta TNM-system tar hänsyn till tumörstorlek och – djup samt den histologiska graden. Även de regionala lymfknutornas tillstånd och eventuella metastaser beaktas. TNM-systemet delar upp tumörer i fyra kategorier enligt ökande svårighetsgrad. Låggradiga tumörer hör till stadiet IA eller IB beroende på tumörens storlek. Icke-metastaserade tumörer av hög grad hör till grupp II eller, om tumören är stor (>5 cm) och ligger djupt, till grupp III. TNM-systemet används inte för klassificering av visceral sarkom och vissa kutana tumörer som Kaposi sarkom. Även angiosarkom är exkluderat. (1,2)

## 1.2 Rabdomyosarkom

### 1.2.1 Översikt

Rabdomyosarkom (RMS) är det vanligaste mjukdelssarkomet och den tredje vanligaste fasta extrakraniala tumören hos barn. 65 % av fallen diagnostiseras hos barn under 6 år och resten hos 7-18-åringar. Sjukdomen är lite vanligare hos pojkar (12). Vissa former av RMS är vanligare hos specifika patientgrupper; exempelvis är RMS i huvud och nacke vanligare hos yngre barn, medan tumörer i extremiteterna är vanligare hos tonåringar (13).

Avgörande för prognosen är rabdomyosarkomets typ, som kan bestämmas histologiskt. De viktigaste typerna av RMS är de embryonala, alveolära, pleomorfa och spolcelliga. Alveolärt RMS är vanligast i extremiteterna samt i huvudet och nacken hos tonåringar. Spolcelligt RMS är predominant i paratestikularregionen hos barn och unga. Embryonalt och alveolärt rabdomyosarkom förekommer ofta på specifika ställen i huvudet och nacken: örongång, parameningeala områden, ögonhålan och bihålor, men också i olika mjukvävnader, i retroperitoneum eller i gallgångarna. Hos patienterna hittas en oömmade massa, och de har sällan några systemiska problem. Symptomen hör ihop med de områden som påverkas av tumören, t.ex. urinretention vid tumör i prostata och diplopi då tumören finns i orbitan (2).

RMS uppvisar skelettmuskeldifferentiering, som i primitiva, dåligt differentierade tumörer kan kräva immunohistologisk färgning eller elektronmikroskopi för att identifieras. Makroskopiskt sett är de embryonala tumörerna oftast myxoida gråvita massor medan alveolära tumörer är köttigare lymfomliknande tumörer (2).

**Embryonalt RMS** påminner starkt om embryots skelettmuskler till både sin fenotyp och de biologiska egenskaperna. Det är den överlägset vanligaste typen av RMS hos barn under 10 år, och endast 17 % av fallen hittas hos tonåringar (15). Trots att embryonalt RMS innehåller celler som är identiska med skelettmuskler under utveckling, uppstår under 9 % i extremiteternas skelettmuskler. 47 % av tumörerna hittas i huvudet och nacken och 27 % i det genitourinära systemet. Andra ställen där tumörer kan hittas är bl.a. i gallgångar, retroperitoneum, pelvis, perineum, buken och olika visceral organ

som levern och njurarna. Embryonalt RMS orsakar många olika symptom hos patienten, vanligen p.g.a. att tumören trycker på andra strukturer. I huvudet och nacken är det vanligt med diplopi, unilateral dövhet och proptos. En tumör i det genitourinära systemet kan orsaka urinretention medan en tumör i gallgångarna leder till ikterus (1).

Histologiskt syns rabdomyoblaster, primitiva mesenkymceller, i olika faser av myogenes. Man ser stjärnformade celler som är de mest primitiva i tumören, med en amfofil cytoplasma och en stor central kärna. Då dessa stjärnceller differentieras blir cytoplasman mer eosinofil och cellerna förlängs och blir spolformade. Färdigt differentierade celler kännetecknas av klar eosinofili, korsbindningar och flera kärnor. Den histologiska arkitekturen påminner om embryomuskler, med myoblastaggregat mellan lucker mesodermvävnad. Embryonalt RMS kännetecknas också av alternerande områden med mycket celler och luckra, myxoida vävnader (1).

De immunologiska markörer som hittas vid skelettmuskeldifferentiering hittas också i embryonala rabdomyosarkomtumörer. Vilka markörer som hittas beror på tumörcellernas differentieringsgrad. I de mest primitiva cellerna hittas endast vimentin, och i rabdomyoblaster under utveckling hittas desmin och aktin. Färdigutvecklade celler påvisar myosin, myoglobin och kreatinkinas. RMS karaktäriseras också av mindre använda muskelmarkörer som acetylkolinreceptorantigener, dystrofin och titin. Vid standardtester för diagnostisering används antikroppar mot MyoD1 och myogenin, eftersom de är mycket känsliga och specifika för rabdomyosarkom (16). Vissa immunologiska markörer färgar ibland abnormt rabdomyosarkomtumörer. Exempel är S100-protein, neurofilament, cytokeratin och B-cellproteiner som CD20 och immunoglobuliner (1).

Embryonalt RMS uppvisar nästan alltid allelförlust i kromosomregion 11p15. Vidare forskning stöder misstanken om att det finns en tumörsuppressorgen i denna region (17). Flera 11p15-gener, som t.ex. IGF2, H19 och CDKN1C uttrycks från endast en av två alleler. Under tumörigenesen av embryonalt RMS inaktiveras alltså den aktiva tumörsuppressorgen genom allelförlust, och den inaktiva genen blir kvar. Cytogenetiska studier har avslöjat komplexa kromosomförändringar, som exempelvis extra kopior av kromosomerna 2, 8 och 13 (18).



**Botryoida rabdomyosarkom** är en undergrupp av embryonala rabdomyosarkom som förekommer främst hos småbarn. De utgör 5-10% av alla RMS-fall. De vanligaste tumörställena är urinblåsan, gallgångar och vagina. Tumörerna finns nära en epitelyta, och har ett område med neoplastiska celler som kallas kambiumlager strax under epitellagret. Tumörerna har en polypoid (vindruvsliknande) struktur. Prognosen är utmärkt, med en femårsöverlevnad på över 95 % (2).

**Spolcelligt RMS** kännetecknas av många förlängda celler och ett tätt stroma bestående av kollagen. Den är en ovanlig typ av embryonalt RMS. Om tumören innehåller alveolära komponenter kan den inte klassas som spolcelligt RMS, men den kan innehålla små områden som liknar embryonalt RMS utan att omklassificeras. Spolcellerna har ofta förgreningar till närliggande celler och kan därför blandas ihop med leiomyosarkom eller fibrosarkom. Renodlade spolcellstumörer har den bästa prognosen av alla rabdomyosarkom, speciellt om tumören finns i paratestikulärregionen, eftersom de sällan metastaserar. 88 % av insjuknade är vid liv efter 5 år (14). Spolcelligt RMS förekommer också i huvudet och nacken, speciellt hos vuxna, men dessa ställen är ovanligare (2).

**Alveolärt RMS** förekommer hos patienter i alla åldrar, och till skillnad från den embryonala varianten förekommer den oftare i tonåringar och vuxna. Medianåldern för de insjuknade är 9 år. Alveolärt RMS förekommer mera sällan än embryonalt RMS, och utgör 21 % av rabdomyosarkomfallen (20).

Alveolära RMS förekommer oftast i extremiteterna, där 39 % av tumörerna uppstår. Andra vanliga ställen är paraspinala regioner, perineum och de paranasala bihålorna. De kliniska symptomen varierar beroende på tumörstället. De paranasala tumörerna kan orsaka proptos eller kranialnervsstörningar och de paraspinala nervrotsabnormaliteter som parestesi, pares eller hypestesi. Makroskopiskt ser alveolära rabdomyosarkomtumörer köttiga och gråaktiga ut, och de innehåller varierande mängder fibrös vävnad.

Alla alveolära RMS uppvisar histologiskt runda celler, och tumörerna påminner om lymfom, men med en primitiv myoblastdifferentiering. Utmärkande för ett typiskt alveolärt RMS är fibrovaskulära septa som separerar tumörcellerna i åtskilda centrum. I

centrumen finns cellkluster som förlorar sin kohesion mot periferin. På septornas yta finns tumörceller. Jätteceller med RMS-differentiering förekommer ofta. Utöver den typiska histologiska strukturen finns också två andra strukturtyper. Solida alveolära RMS har ingen fibrovaskulär stroma, och bildar lager av runda celler som ofta har endast lite RMS-differentiering. Blandade embryonala/alveolära RMS innehåller områden med embryonal histologi, alltså en myxoid stroma och spolcellsmioblaster, och andra områden med alveolär histologi (2).

Alveolära RMS färgas med antikroppar mot muskelproteiner, precis som den embryonala varianten. Primitiva tumörer kan ändå färgas negativt. MyoD-relaterade färgningar, speciellt myogenin uppvisar ofta en stark, diffus kärnfärgning.

Cytogenetiska undersökningar har påvisat translokationer som kan associeras specifikt med alveolärt RMS. Dessa translokationer flyttar PAX3- och PAX7-generna på kromosom 2 respektive 1 till FKHR-genen på kromosom 13, vilket leder till uppkomsten av chimära gener som kodar för PAX/FKHR- och PAX7/FKHR-fusionsproteiner (21). De två fusionerade generna innehåller PAX3:s eller PAX7:s DNA-bindande region och FKHR:s transkriptionsstartande region, och fungerar därför som en stark transkriptionsaktiverare. Utöver den funktionella förändringen, ger translokationerna även upphov till förändringar i expressionen av reglerande räckor så att stora mängder chimära proteiner hålls kvar i kärnan. Dessa förändringar leder till en effektiv aktivering av transkriptionsmål som utövar en onkogen effekt genom att kontrollera cellens proliferering, differentiering och apoptos. En undersökning visar att de genetiska fusionerna kan användas för att få en exaktare prognos. PAX7/FKHR-positiva tumörer beter sig ofta mer godartat än PAX3/FKHR-positiva tumörer (22).

**Pleomorft RMS** diagnosticeras nästan endast hos vuxna. Denna form av RMS är vanligare hos män och medianåldern för de insjuknade är 50–70 år (23). Tumörerna förekommer oftast i djupa mjukvävnader i de nedre extremiteterna men de kan även hittas på ett stort antal andra ställen. Till den kliniska bilden hör smärftfulla, snabbt växande svullnader med nekrotiska områden. Tumörerna är stora (5–15 cm i diameter) och omges ofta av pseudokapslar. Snittytan är vitaktig och fast.

Histologiskt syns underliga polygonala och runda celler samt spolceller, vilka uppvisar skelettmuskeldifferentiering. De polygonala cellerna har en starkt eosinofil cytoplasma. Korsbindningar är mycket ovanliga. För att en tumör skall klassas som pleomorft RMS, får den inte uppvisa embryonal eller alveolär struktur. Som de andra typerna av RMS uppvisar pleomorfa tumörer myoglobin, MyoD1, skelettmuskelmyogenin och desmin. MyoD1 och myogeninproverna syns som mindre positiva än vid pediatrika rabdomyosarkom (2).

### 1.2.2 Allmänna genetiska förändringar

Insuline Growth Factor 2 (IGF-2) expresseras i både alveolära och embryonala RMS. Denna överexpression kan leda till autokrin stimulering av tumörtillväxten (24).

Myogenic determination protein-1 (MyoD1) hör till en grupp transkriptionsfaktorer som endast expresseras i skelettmuskler. Andra myogena reglerande proteiner är myogenin, myf-5 och myf-6. Dessa transkriptionsfaktorer påverkar andra myogena gener som desmin, myosin och kreatinkinas, inducerar deras transkription och startar skelettmuskeldifferentieringen. MyoD-familjens proteiner orsakar ändå inte tumörgenes. Normalt är de inaktiverade i differentierade muskelceller, men i RMS hålls de aktiva. Generna fungerar därför som en bra markör för skelettmuskeldifferentiering. En studie pekar på att graden av metylering i den genreglerande CpG-regionen i MyoD1-genen kan höra ihop med tumörtypen. Vid alveolärt RMS är CpG-regionen i stort sett ometylerad, medan den i 90 % av de embryonala RMS-fallen är delvis metylerad (25).

Det finns inte många kända riskfaktorer för RMS, men en av dem är Li-Fraumeni-syndromet med den tillhörande deletionen av p53-genen. p53 är en tumorsuppresserande gen som binder till DNA och reglerar cellcykeln. Den har en kort halveringstid. 50 % av rabdomyosarkomen uppvisar en muterad p53 (26). Den muterade p53-genen har en längre halveringstid och kan störa cellcykeln. Normalt inhiberar p53 transkriptionen av IGF2, vilket kan förklara överexpressionen av genen i rabdomyosarkom (2).

### 1.2.3 Immunohistokemi

Man får bevis för myogen differentiering genom att immunohistokemiskt markera olika aktiner, desmin och myogena reglerande proteiner. Det finns många isoformer av aktin, men RMS färgas av muskelspecifikt aktin som känner igen  $\alpha$ -aktin (finns i skelettmuskler, glatta muskler och hjärtmuskeln) samt  $\gamma$ -aktin (glattmuskelaktin). Glattmuskelaktin är mer specifikt för glattmuskeltumörer, men kan färga ovanliga rabdomyosarkom och t.o.m. rabdomyom. Aktin färgar cellernas cytoplasma då testet är positivt (2).

Desmin är ett intermediärfilament (10 nm) som finns i glattmuskel- och skelettmuskeltumörer men också i icke-neoplastiska vävnader. Desmin verkar vara en pålitlig markör för myogen differentiering i RMS, och kan vara positiv i fall där tumören inte färgas av aktin. Desmin färgar cytoplasman.

Myoglobin är en specifik markör för skelettmuskler. Myoglobin är ett syrebärande hem-protein i skelett- och hjärtmuskler, även om det också kan hittas i små mängder i sköldkörteln och thymus. Problemet med myoglobin som markör är att de histologiska bevisen på myogenes är tydliga vid det laget då myoglobinprovet visar positivt. Trots det kan myoglobin användas för att utvärdera kemo- och radioterapins effekt i redan behandlade patienter (2).

Just nu är de effektivaste och mest specifika markörerna för skelettmuskeldifferentiering antikroppar mot myogenin och MyoD1. De hör båda till MyoD-familjens proteiner, och är båda transkriptionsfaktorer som finns i kärnan. De är utmärkta immunohistokemiska markörer och kärnfärgningen är mycket specifik för RMS. Vid färgning med anti-MyoD1 kan icke-specifik färgning av cytoplasman förekomma, och detta bör tolkas som ett negativt resultat (27).

### 1.2.4 Prognos

Femårsöverlevnaden för barn då man granskar alla histologiska undergrupper av RMS är ungefär 65 %. Överlevnadsgraden beror främst på stadiet, den histologiska undergruppen och hur bra resektionen har lyckats. Hos vuxna är antalet

rabdomyosarkomfall så litet att det är omöjligt att jämföra överlevnaden med barnens (2).

Embryonala RMS-tumörer har en bättre prognos än den alveolära varianten hos barn, och speciellt bra är prognosen hos patienter med spolcelliga RMS och botryoida RMS. (19). Yngre patienters prognos är i allmänhet bättre. Spolcellsvarianten är aggressiv hos vuxna, och typen av RMS verkar inte ha någon prognostisk relevans hos vuxna (1).

Embryonala RMS med en diffus anaplasi kan ha en sämre prognos än andra undergrupper av embryonalt RMS. Tumörer i det parameningeala området och i extremiteterna kan ha en sämre prognos och orbitala och paratestikulära tumörer en bättre prognos jämfört med andra områden (1).

Prognosen för pleomorft RMS är dålig. I två studier med uppföljning dog 74 % av patienterna (23, 28).

### 1.2.5 Stadieindelning och kliniska riskgrupper

De kliniska riskgrupperna delar in patienter i grupper med låg risk, medelstor risk och hög risk. Indelningen görs på basen av tumörens histologiska typ, ställe, storlek och det patologiska TNM-systemet.

För den **patologiska stadieindelningen** (tabell 1) används ett TNM-stadieindelningssystem utvecklat av Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group. Det är alltså inte det system som beskrivs i AJCC:s cancerstadieindelningsmanual.

Tabell 1: Patologisk stadieindelning av rabdomyosarkom

Klassifikation	Beskrivning
<b>Tumör</b>	
T1	Begränsad till ursprungsstället
T1a	Tumörstorlek <5 cm
T1b	Tumörstorlek ≥5 cm
T2	Utsträckning till/infiltration av omgivande vävnad
T2a	Tumörstorlek <5 cm
T2b	Tumörstorlek ≥5 cm
<b>Regionala lymfknutor</b>	
N0	Lymfknutor inte kliniskt involverade
N1	Lymfknutor kliniskt involverade
NX	Den kliniska lymfnodsstatusen okänd
<b>Metastaser</b>	
M0	Inga metastaser
M1	Metastaser finns

Den **kliniska stadieindelningen** (tabell 2) utförs genom att använda Intergroup Rhabdomyosarcoma Pretreatment Clinical Staging System som baserar sig på det patologiska TNM (tabell 1).

Tabell 2: Klinisk stadieindelning av rabdomyosarkom

Stadium	Ställe	T	Tumörstorlek	N	M
1	Fördelaktigt	T1 eller T2	Alla	N0, N1, NX	M0
2	Ofördelaktigt	T1 eller T2	<5 cm	N0, NX	M0
3	Ofördelaktigt	T1 eller T2	<5 cm	N1	M0
		ELLER	≥5 cm	N0, N1, NX	M0
4	Alla	T1 eller T2	Alla	N0, N1	M1

Fördelaktiga ställen är gallgångar, ögonhålan, huvudet, nacken (inte parameningealområden) och genitourinära områden. Alla andra ställen är ofördelaktiga.

Den **kliniska gruppen** (tabell 3) bestäms genom att använda Intergroup Rhabdomyosarcoma Clinical Grouping System som baserar sig på sjukdomens utsträckning.

Tabell 3: Kliniska grupper av rabdomyosarkom

Grupp	Sjukdomens utsträckning
<b>Grupp I</b>	<b>Lokaliserad sjukdom, exciserad</b>
Grupp Ia	Begränsad till ursprungsstället
Grupp Ib	Infiltrerande, utanför ursprungsstället; negativa lymfknutor
<b>Grupp II</b>	<b>Total resektion med regional tumörspridning</b>
Grupp IIa	Lokaliserad tumör med mikroskopisk residualsjukdom
Grupp IIb	<ul style="list-style-type: none"> <li>Regional sjukdom med positiva lymfknutor, exciserad</li> <li>Ingen mikroskopisk residualsjukdom</li> </ul>
Grupp IIc	<ul style="list-style-type: none"> <li>Regional sjukdom med positiva lymfknutor</li> <li>Makroskopiska tumörer resekerade, mikroskopisk residualsjukdom</li> </ul>
<b>Grupp III</b>	<b>Makroskopisk residualsjukdom (över 1 cm delar kvar av tumören)</b>
Grupp IIIa	Lokaliserad eller regional sjukdom, biopsi
Grupp IIIb	Lokaliserad eller regional sjukdom, resektion (avlägsnande av över 50% av tumören)
<b>Grupp IV</b>	<b>Distanta metastaser</b>

Med hjälp av den kliniska gruppen och stadiet kan man avgöra den **kliniska riskgruppen** (tabell 4). Till det används Children's Oncology Group Stratification for Rhabdomyosarcoma.

**Tabell 4: Kliniska riskgrupper**

Histologisk undergrupp	Klinisk Grupp	Kliniskt stadium	Klinisk riskgrupp
Embryonal	I,II,III	1	Låg risk
Embryonal	I,II	2,3	Låg risk
Embryonal	III	2,3	Medelstor risk
Embryonal	IV	4	Hög risk
Alveolär	I,II,III	1,2,3	Medelstor risk
Alveolär	IV	4	Hög risk

### 1.2.6 Vård av rabdomyosarkom

Vården av RMS påminner stort om vården av andra mjukdelssarkom. En fullständig kirurgisk resektion rekommenderas om den inte är mutilerande eller kosmetiskt otillfredsställande. Cytostatika och strålbehandling används för att maximera tillfriskningschansen. Typen av vård och dess effektivitet beror på cancers kliniska grupp, histologiska undergrupp och var tumören finns (29).

Yang et al. fann år 1998 att strålbehandling är ett effektivt sätt att förhindra lokala återfall av RMS, men även att patienter med låg återfallsrisk inte drar nytta av strålbehandling (30). Strålbehandling används alltid om det är frågan om alveolärt RMS, även om tumörerna blivit borttagna helt och hållet innan kemoterapien påbörjats. Strålbehandling används också på patienter med embryonalt RMS som hör till de kliniska grupperna II, III och IV. Ett undantag är flickor med embryonalt RMS i genitalierna, som sköts med konservativ kirurgi och cytostatika. Strålbehandlingen ges oftast efter att 4–5 kemoterapicykler slutförts. Beroende på tumörens ställe, storlek och grupp ges mellan 20 och 28 strålbehandlingar (31). Man kunde inte se en skillnad mellan



hyperfraktionerad och konventionellt fraktionerad strålbehandling i IRS-IV-undersökningen (32).

Alla patienter med RMS behandlas med cytostatika för att maximera tillfriskningschansen. Syftet med kemoterapi är att eradikera osynliga mikrometastaser och synliga metastaser och således minska risken för att cancerrelaps. Kemoterapi ges intravenöst och behandlingen tar oftast 6–12 månader. Cytostatika ges i 2–5 dagars ”pulser” med 3–4 veckors mellanrum. Läkemedlen som används beror delvis på den kliniska riskgruppen. Hos barn i lågriskgruppen används en kombination av vincristin och dactinomycin (även känt som actinomycin-D) som brukar förkortas till VA. Ibland läggs även cyklofosfamid till, och denna kombination av tre mediciner kallas VAC. VAC används också för patienter med medelstor risk och hög risk, men har dålig effekt på de sistnämnda. Vid behov kan man också lägga till irinotecan, topotecan, ifosfamid, etoposid eller doxorubicin (29). Kemoterapi användes tidigare ofta endast postoperativt, men i Finland har man övergått till att vid de flesta RMS-fall även administrera neoadjuvant kemoterapi. Detta resulterar i att tumören krymper och går i nekros, vilket gör det lättare att skona vitala organ under operationen (40).

### 1.3 Tissue Microarray-tekniken

Tissue Microarray-tekniken (TMA-tekniken) är en molekylbiologisk teknik som möjliggör utvärdering av expressionen av gener och genprodukter i hundratals vävnadsprover samtidigt. Tekniken tillåter patologer att utföra storskaliga analyser med hjälp av immunohistokemi, fluorescens in situ-hybridisering (FISH) eller RNA in situ-hybridisering (ISH) snabbare och till ett lägre pris jämfört med konventionella histopatologiska metoder (33).

TMA-tekniken i sin moderna form är relativt ny. Tekniken beskrevs för första gången för över 30 år sedan av Battifora, som beskrev en metod där han lindade in 1 mm tjocka cylindrar av olika vävnader in i ett lager tunntarm, som sedan slöts i ett paraffinblock och skars i tunna skivor som undersöktes (34). Array-formatet utvecklades av Wan et al. år 1987, och metoden tog slutligen luft under vingarna då Kononen et al år 1998 uppfann

en maskin som snabbt och exakt konstruerade TMA-block på ett sätt som var lätt att tillämpa på de flesta patologilaboratorier (35,36).

Tissue microarrays är paraffinblock som konstruerats genom att extrahera cylindriska vävnadsprover från olika donatorparaffinblock och innesluta dem i ett enskilt microarray-block vid definierade koordinater, vilket gör det lätt att identifiera de olika vävnaderna i fortsättningen. Donatorblocken snittas först i standardtjocka skivor som färgas med hematoxylin och eosin. En patolog undersöker skivorna för att hitta ett passande område för undersökningen. (37).

De intressanta områdena markeras med en dator, varefter en TMA-maskin skär ut de korresponderande vävnadskärnorna från donatorblocket och placerar in dem på ett tomt paraffinblock. Cylindrarna kan ha en diameter på t.ex. 0,6 mm och placeras 0,7–0,8 mm från varandra, och på detta sätt kan man placera ca 600 vävnadskärnor i samma paraffinblock. Kärnorna ges specifika koordinater. Från TMA-blocket kan man sedan snitta t.ex. 5 µm tjocka skivor som används till molekylär och immunohistokemisk analys.

TMA-tekniken har många fördelar jämfört med konventionella tekniker. Genom att ta flera vävnadsbiopsier från samma donatorblock kan man mångfaldiga mängden färgningar och andra undersökningar som kan utföras innan vävnaden tar slut. TMA-tekniken möjliggör undersökning av ett stort antal prover samtidigt, vilket betyder att det krävs mindre mängder potentiellt dyra reagenser och mindre personal, och det går åt mindre tid (37,38). TMA-tekniken bidrar även till den experimentella enhetligheten genom att alla vävnadsprover behandlats exakt likadant. Variabler som temperatur, inkubationstider, tvättprocedurer och reagentkoncentrationer är standardiserade för hela kohorten. TMA-tekniken förstör inte heller det ursprungliga blocket, som ännu kan användas för diagnosticering eller andra undersökningar.

En av de största nackdelarna med TMA-tekniken är att de små vävnadskärnorna inte representerar hela tumören, vilket är ett speciellt stort problem vid undersökning av heterogena cancertyper som prostata-adenocarcinom och Hodgkins lymfom (37). Undersökningar har dock visat att det finns en stor enhetlighet mellan TMA-fläckarna och helsektioner av samma vävnadsprov. Till exempel kom Camp et al fram till att analys

av två kärnsektioner av ett vävnadsprov kunde jämföras med analys av helsektionen i över 95% av fallen (39). Ett annat, mindre problem är att en eller flera kärnsektioner kan fattas på ett immunofärgat snitt.

## 2 Målsättning

TMA-tekniken växer i popularitet och används vid studie av allt fler olika typer av vävnadsprover. För att effektivt kunna utnyttja TMA-tekniken, måste det finnas bevis på att tekniken fungerar på en viss typ av vävnadsprov.

Målsättningen vid denna studie var att producera ett TMA-material som utgjordes av rabdomyosarkomprover och att evaluera TMA-blockets användningsmöjligheter. För detta användes alla tillgängliga rabdomyosarkomprover som lagrats i Helsingfors universitetssjukhus.

## 3 Material och metoder

Undersökningen påbörjades genom att beställa alla tillgängliga mikroskopglas och korresponderande block med rabdomyosarkomprover från förrådet. Till detta ändamål användes Helsingfors Universitets patologiska fakultets Qpati-databas. Sökorden som användes var "rhabdomyosarcoma", "rhabdomyosarcoma alveolar" och "rhabdomyosarcoma embryonal". Glasen och provbitarna som användes i undersökningen var från åren 1982 till 2013. Helsingfors universitets medicinska fakultets forskningsetiska delegation gav etiskt tillstånd för studien (HUS/2449/2017).

Då glasen anlönt utvärderades de för att verifiera att det verkligen var fråga om rabdomyosarkom och att blocket var lämpligt för denna undersökning. De flesta glas var färgade med hematoxylin och eosin, men en del hade färgats med immunohistokemiska

markörer som desmin, myoglobin, myogenin och MyoD1, vilket underlättade identifieringen av lämpliga kandidater till undersökningen.

De korresponderande blocken till glasen som bedömts lämpliga för denna undersökning beställdes från lagret. Efter att blocken anlant kontrollerades det att vävnaden i blocken stämde överens med glasen. En del av blocken måste förkastas på grund av vävnadsbiopsins otillräckliga tjocklek eller ringa mängd tumörcellstruktur.

Glasen som korresponderade till blocken som valts skannades till digital form (3DHISTECH Panoramic Scan). Om inga lämpliga glas fanns, snittades nya snitt med en tjocklek på 4 µm från blocket och snitten färgades med hematoxylin och eosin. Efter det kunde de digitaliseras.

De digitaliserade glasen fördes in i annoteringsprogrammet CaseViewer 3D Histech, där 2–4 områden per block (diameter 1 mm) med tydlig tumörstruktur annoterades. En tissue microarray (TMA Grand Master (3DHISTECH, Budapest, Ungern) skar sedan ut korresponderande vävnadskärnor från vävnadsproverna och placerade in dem i ett TMA-paraffinblock. För granskning av blocket färgades snitten med desmin och Myf4.

## 4 Resultat

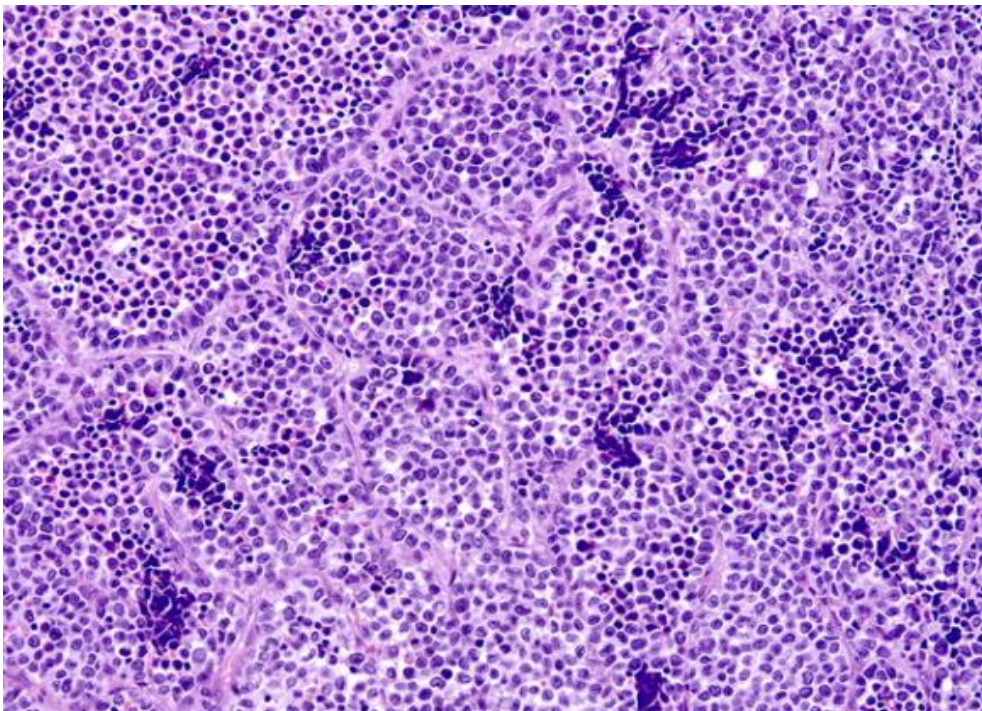
Sökningen resulterade i 177 vävnadsprover från 83 olika patienter. Till granskning kom 147 prover, varav 9 hade använts till slut och måste uteslutas från undersökningen. I den slutgiltiga utvärderingen inkluderades alltså 138 prover.

I fyra av dessa 138 prover fanns ingen malign vävnad. 68 prover uteslöts eftersom de inte innehöll tillräckligt med material för ett TMA-block.

Det slutgiltiga TMA-blocket innehöll material från 56 olika vävnadsprover, med 1–2 vävnadskärnor per prov. 21 av dessa prover var från primärtumörer innan vården påbörjats, 12 från primärtumörer efter att vården genomförts, 9 från metastaser innan vården påbörjats, 2 från recidiv före vården påbörjats och 12 från malign vävnad som

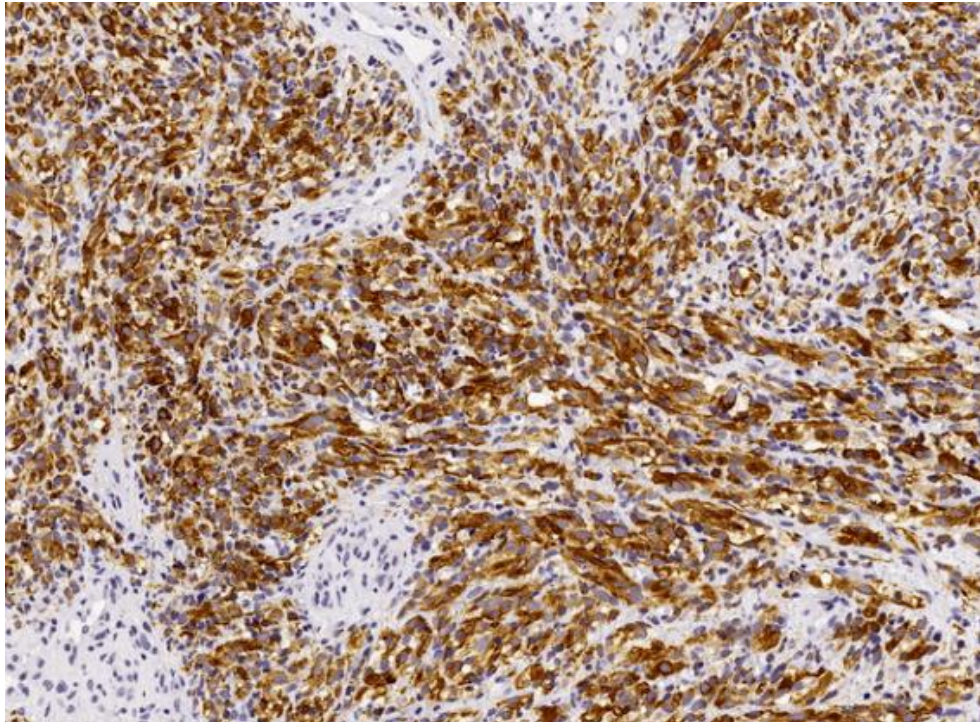
inte identifierats vid detta skede. Tre kärnor hade misslyckats på grund av att kärnorna veckat sig under insättningen i blocket. Slutligen kunde positiviteten bestämmas från 53 prover.

33 (62%) prover var Myf4-positiva och 20 Myf4-negativa. 38 (72%) prover var desmin-positiva och 15 desmin-negativa. 31 (58%) prover var både Myf4- och desmin-positiva. 13 (25%) prover var både Myf4- och desmin-negativa.

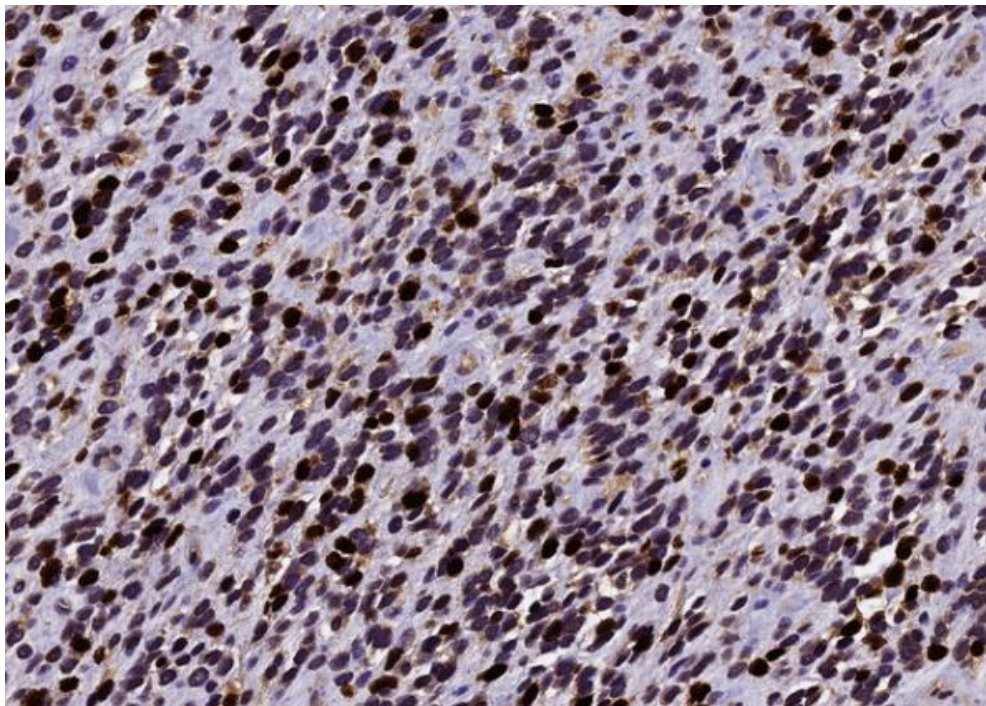


**Bild 1: Alveolärt RMS färgat med hematoxylin och eosin**





**Bild 2: Desmin-positivt embryonalt RMS**



**Bild 3: Myf4-positivt alveolärt RMS**

## 5 Diskussion

Projektets mål uppnåddes. Det producerades ett lyckat TMA-block med material från 56 olika vävnadsprover från 54 patienter med RMS. Blockets funktion validerades immunohistokemiskt.

TMA-blocket kan i framtiden utnyttjas i andra forskningsprojekt inriktade på RMS. TMA-tekniken möjliggör snabb färgning och analys av ett stort antal vävnadssnitt samtidigt, vilket kommer att försnabba och underlätta vidare forskning.

I dessa dagar administreras oftast neoadjuvant kemoterapi innan den operativa behandlingen genomförs. Detta leder till att tumörmassan krymper och till stora delar förstörs, vilket märks i mängden tumörprover som slutligen kunde användas i TMA-blocket. Av de 177 prover som beställdes kunde endast 56 användas i TMA-blocket.

Eftersom största delen av de tumörprover som slutligen kunde inkluderas i TMA-blocket hade utsatts för preoperativ onkologisk behandling på samma sätt som de prover som förkastades, verkar det som om dessa tumörer inte reagerade på kemoterapin. Det är alltså möjligt att tumörproverna i TMA-blocket representerar en undergrupp av RMS som den konventionella kemoterapibehandlingen inte fungerar på.

Av de 13 prover som färgades negativt för både Myf4 och desmin var 5 prover från 3 patienter som vårdats år 1982–83. Vidare var två av de dubbelnegativa proverna från primärtumörer före vården påbörjats, 1 prov från ett recidiv, 2 prover från metastaser i en patient och 3 prover från primärtumörer efter att vården genomförts.

Det är möjligt att de dubbelnegativa tumörproverna inte härrör från RMS, utan att det varit fråga om en felaktig diagnos. Alla tumörprover hade nämligen inte färgats med immunohistokemiska markörer, vilket ledde till att en del av proverna togs med i studien endast på basis av tumörens morfologi. En sak som hade kunnat öka andelen verkliga RMS-prover i det slutliga TMA-blocket skulle ha varit att immunohistokemiskt färga alla provbitar redan innan de sattes in i TMA-blocket, och utesluta alla dubbelnegativa prover.

Det är även möjligt att de prover som färgats negativt för både Myf4 och desmin trots allt härstammar från RMS-tumörer, men att materialet är så gammalt att

immunohistokemisk färgning inte längre fungerar. Genom att utesluta de äldsta proverna från TMA-blocket kunde det ha varit möjligt att öka andelen användningsbara tumörprover i det slutliga TMA-blocket.

Det TMA-block som nu producerats kommer i framtiden att försnabba och förenkla vidare forskning inom rabdomyosarkom. Ett intressant område för möjlig kommande forskning är den stora mängd tumörprover i TMA-blocket som utsatts för preoperativ kemoterapi, men som inte reagerat på vården. Det kunde i framtiden vara möjligt att identifiera en ny egenskap hos vissa rabdomyosarkomtumörer som gör dem behandlingsresistenta.



## 6 Källförteckning

- (1) Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F. World health organization classification of tumours. Pathology and genetics of soft tissue and bone. Lyon: IARCPress 2002.
- (2) Miettinen, M. Diagnostic soft tissue pathology. Churchill Livingstone 2002.
- (3) Cormier JN, Pollock RE. Soft tissue sarcomas. CA Cancer J Clin. 2004; 54:94-109.
- (4) Coindre JM, Terrier P, Guillou L, et al. Predictive value of grade for metastasis development in the main histologic types of adult soft tissue sarcomas: A study of 1240 patients from the French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group. Cancer 2001; 91:1914-26.
- (5) Fong Y, Coit DG, Woodruff JM, Brennan MF. Lymph node metastasis from soft tissue sarcoma in adults. analysis of data from a prospective database of 1772 sarcoma patients. Ann Surg. 1993; 217:72-7.
- (6) Brady M, Gaynor J. Brennan M. Radiation-associated sarcoma of bone and soft tissue. Arch Surg. 1992; 127:1379-85.
- (7) Smith AH, Pearce NE, Fisher DO, Giles HJ, Teague CA, Howard JK. Soft tissue sarcoma and exposure to phenoxyherbicides and chlorophenols in New Zealand. J Natl Cancer Inst. 1984; 73:1111-7.
- (8) Muller R, Hajdu SL, Brennan MF. Lymphangiosarcoma associated with chronic filarial lymphedema. Cancer 1987; 59:179-83.
- (9) Levine EA. Prognostic factors in soft tissue sarcoma. Semin Surg Oncol 1999; 17
- (10) Vorburger SA, Hunt KK. Experimental Approaches. I Pollock RE, editor. Soft Tissue Sarcomas. Hamilton, Ontario, BC Decker, Inc.; 2002. Sid. 89–109.
- (11) Latres E, Drobnjak M, Pollack D, et al. Chromosome 17 abnormalities and TP53 mutations in adult soft tissue sarcomas. Am J Pathol 1994; 145:345–355.

- (12) Wexler L, Helman L. Rhabdomyosarcoma and the undifferentiated sarcomas. In Pizzo P, Poplack D, editors. *Principles and Practice of Pediatric Oncology*, 3rd Edition. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997. Sid. 799-829.
- (13) Dagher R, Helman L. Rhabdomyosarcoma: An overview. *Oncologist* 1999; 4:34-44.
- (14) Qualman SJ, Coffin CM, Newton WA. Intergroup Rhabdomyosarcoma Study: Update for Pathologists. *Pediatr Pathol* 1998; 1:550.
- (15) Gurney JG, Davis S, Severson RK, Fang JY, Ross JA, Robison LL. Trends in cancer incidence among children in the U.S. *Cancer* 1996; 78: 532-541.
- (16) Cessna MH, Zhou H, Perkins SL, Tripp SR, Layfield L, Daines C, Coffin CM. Are myogenin and myoD1 expression specific for rhabdomyosarcoma? A study of 150 cases, with emphasis on spindle cell mimics. *Am J Surg Pathol* 2001; 25:1150-1157.
- (17) Koi M, Johnson LA, Kalikin LM, Little PF, Nakamura Y, Feinberg AP. Tumor cell growth arrest caused by subchromosomal transferable DNA fragments from chromosome 11. *Science* 1993; 260:361-364.
- (18) Gordon T, McManus A, Anderson J, Min T, Swansbury J, Pritchard-Jones K, Shipley J. Cytogenetic abnormalities in 42 rhabdomyosarcoma: a United Kingdom Cancer Cytogenetics Group Study. *Med Pediatr Oncol* 2001; 36:259-267.
- (19) Raney RB, Anderson JR, Barr FG, Donaldson SS, Pappo AS, Qualman SJ, Wiener ES, Maurer HM, Crist WM. Rhabdomyosarcoma and undifferentiated sarcoma in the first two decades of life: a selective review of intergroup rhabdomyosarcoma study group experience and rationale for intergroup rhabdomyosarcoma study V. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology* 2001; 23:215-20.
- (20) Newton WA, Jr., Soule EH, Hamoudi AB, Reiman HM, Shimada H, Beltangady M, Maurer H. Histopathology of childhood sarcomas, Intergroup Rhabdomyosarcoma Studies I and II: clinicopathologic correlation. *J Clin Oncol* 1988; 6:67-75.
- (21) Kelly KM, Womer RB, Sorensen PH, et al. Common and variant gene fusions predict distinct clinical phenotypes in rhabdomyosarcoma. *J Clin Oncol* 1997; 15:1831-1836.

- (22) Kelly KM, Womer RB, Sorensen PH, Xiong QB, Barr FG. Common and variant gene fusions predict distinct clinical phenotypes in rhabdomyosarcoma. *J Clin Oncol* 1997; 15:1831-1836.
- (23) Furlong MA, Mentzel T, Fanburg-Smith JC. Pleomorphic rhabdomyosarcoma in adults: a clinicopathologic study of 28 cases with emphasis on morphologic variants and recent skeletal muscle-specific markers. *Mod Pathol* 2001; 14:595-603.
- (24) Minniti CP, Tsokos M, Newton WAJ, Helman LJ. Specific expression of insulin-like growth factor-II in rhabdomyosarcoma tumor cells. *American Journal of Clinical Pathology* 1994;101:198-203.
- (25) Chen B, Dias P, Jenkins JJ, Savell VH, Parham DM. Methylation alterations of the MyoD1 upstream region are predictive of subclassification of human rhabdomyosarcomas. *American Journal of Pathology* 1998; 152:1071-1079.
- (26) Merlino G, Helman LJ. Rhabdomyosarcoma – working out the pathways. *Oncogene* 1999; 18:5340
- (27) Cui S, Hano H, Harada T, Takai S, Masui F, Ushigome S. Evaluation of new monoclonal anti-MyoD1 and anti-myogenin antibodies for the diagnosis of rhabdomyosarcoma. *Pathology international* 1999; 49:62-68.
- (28) Gaffny EF, Dervan PA, Fletcher CD. Pleomorphic rhabdomyosarcoma in adulthood. Analysis of 11 cases with definition of diagnostic criteria. *Am J Surg Pathol* 1993; 17:677-687.
- (29) Dagher R, Helman L. Rhabdomyosarcoma: an overview. *Oncologist* 1999; 4:34-44.
- (30) Yang JC, Chang AE, Baker AR, et al. Randomized prospective study of the benefit of adjuvant radiation therapy in the treatment of soft tissue sarcomas of the extremity. *Journal of Clinical Oncology* 1998; 16(1):197-203.
- (31) <http://sarcomahelp.org/rhabdomyosarcoma.html> (Hämtat 14/11/17 kl. 11.45)

- (32) Donaldson SS, Meza J, Breneman JC, et al. Results from the IRS-IV randomized trial of hyperfractionated radiotherapy in children with rhabdomyosarcoma – A report from the IRSG. *Internal Journal of Radiation Oncology Biology & Physics* 2001; 51:718-728.
- (33) Skacel M, Skilton B, Pettay JD, Tubbs RR. Tissue microarrays: a powerful tool for high-throughput analysis of clinical specimens: a review of the method with validation data. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2002; 10:1–6.
- (34) Battifora H. The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing. *Lab Invest.* 1986; 55:244–248.
- (35) Wan WH, Fortuna MB, Furmanski P. A rapid and efficient method for testing immunohistochemical reactivity of monoclonal antibodies against multiple tissue samples simultaneously. *J Immunol Methods* 1987; 103:121–129.
- (36) Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998; 4:844–47.
- (37) Shergill IS, Shergill NK, Arya M, Patel HR. Tissue microarrays: a current medical research tool. *Curr Med Res Opin* 2004; 20:707–12.
- (38) Rimm DL, Camp RL, Charette LA, Olsen DA, Provost E. Amplification of tissue by construction of tissue microarrays. *Exp Mol Pathol* 2001; 70:255–64.
- (39) Camp RL, Charette LA, Rimm DL. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab Invest* 2000; 80:1943–1949.
- (40) Joensuu H, Roberts PJ, Kellokumpu-Lehtinen PL, Jyrkkö S, Kouri M, Teppo L. *Syöpätaudit. Duodecim* 2013.
- (41) Friend SH, Bernards R, Rogelj S, et al. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 1986;323(6089):643-646.

(42) Toguchida J, Yamaguchi T, Dayton SH, et al. Prevalence and spectrum of germline mutations of the p53 gene among patients with sarcoma. *N Engl J Med* 1992;326(20):1301-1308.

Tabell 1&2: Lawrence WJ, Anderson JR, Gehan EA, Maurer H. Pretreatment TNM staging of childhood rhabdomyosarcoma: a report of the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group. Children's Cancer Study Group. Pediatric Oncology Group. *Cancer* 1997; 80:1165-1170.

Tabell 3&4: Malempati S, Hawkins DS. Rhabdomyosarcoma: Review of the Children's Oncology Group (COG) Soft-Tissue Sarcoma Committee Experience and Rationale for Current COG Studies. *Pediatric blood & cancer* 2012; 59(1):5-10.